

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 38—40, Januar 1970

Isoenzyme der Fructose-Phosphat-Aldolase im Serum von Ratten mit durch Diäthylnitrosamin induzierten Lebertumoren

Von A. L. DIKOW und D. HADJIOLOV

Aus der Biochemischen Abteilung und der Abteilung für Experimentalkarzinogenese des Onkologischen Forschungsinstituts (Direktor: Prof. N. Antchew), Sofia/Bulgarien

(Eingegangen am 12. August 1969)

Die Gesamtaktivität und das Isoenzymmuster der Serumaldolase wurden an Ratten mit durch Diäthylnitrosamin induzierten primären Lebertumoren untersucht. Es werden eine wesentliche Erhöhung der Aldolaseaktivität des Serums sowie Veränderungen in ihrem Isoenzymmuster nachgewiesen. Im kathodischen Teil des Zymogramms der Serumaldolase treten vier Isoenzymfraktionen vom Typ Leber Aldolase B auf, die nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit mit den vier kathodischen Fraktionen der Tumoralldolase übereinstimmen. Solche Veränderungen im Isoenzymmuster der Serumaldolase konnten von den Verfassern bei infektiösen oder toxischen Leberschädigungen niemals nachgewiesen werden; sie haben wegen ihres spezifischen Charakters eine wichtige Bedeutung für die Tumordiagnostik.

Isoenzymes of fructose phosphate aldolase in the serum of rats with liver tumours induced by diethylnitrosamine

The total activity and isoenzyme pattern of serum aldolase were studied in rats with primary liver tumours induced by diethylnitrosamine. In comparison with normal serum, the aldolase activity was increased and the isoenzyme pattern was changed. The cathodic part of the serum aldolase zymogram showed four isoenzyme fractions attributable to type B liver aldolase, and these were electrophoretically identical with the four cathodic fractions of the tumour aldolase. Similar changes in the isoenzyme pattern of serum aldolase could not be found in any cases of infectious or toxic liver damage; in view of the specific nature of these changes, they are important in tumour diagnosis.

WARBURG und CHRISTIAN stellten 1943 einen „wesentlichen Anstieg der Serumaldolase bei Ratten mit transplantiertem Jensen-Sarkom“ fest (1). Später beobachteten eine Reihe von Verfassern eine Erhöhung der Serumaldolaseaktivität bei Kranken mit verschiedenen Tumoren (Prostatakarzinom, Karzinom der Harnblase) und insbesondere mit Lebertumoren (2, 3). Da die Aldolaseaktivität im Serum auch bei anderen Leberkrankheiten steigt (infektiöse und toxische Hepatitis, Metastasen von anderen Tumoren) (4, 5, 6, 7), ist die Untersuchung des Isoenzymmusters der Aldolase für die Diagnostik von großem Interesse. In vorhergehenden Mitteilungen studierten wir das Isoenzymmuster der Serumaldolase bei Menschen mit infektiöser Hepatitis (8), sowie an Ratten, deren Leber mit verschiedenen Agentien beschädigt war (9, 10, 11). In vorliegender Arbeit untersuchten wir das Isoenzymmuster der Serumaldolase an Ratten mit Diäthylnitrosamin induzierten primären Lebertumoren.

Material und Methoden

Die Versuche wurden an männlichen Albinoratten von etwa 140 g Gewicht durchgeführt. Die Tiere bekamen im Trinkwasser täglich 1 mg Diäthylnitrosamin 6mal wöchentlich während 165 Tagen. Am 210. Tage nach Versuchsbeginn waren die Tumoren leicht durch die Bauchwand zu palpieren. Danach wurden die Tiere durch die A. femoralis entblutet. Im Blutserum bestimmten wir die Gesamtdolaseaktivität durch den Aldolase UV-Test, Fa. Boehringer, Mannheim. Die Isoenzyme der Aldolase trennten wir elektrophoretisch auf 0,6proz. Agarosegel mit Tris/EDTA/Borsäure-Puffer pH 8,9 nach früher beschriebenen Verfahren (12). Die Detektion der Isoenzymfraktionen der Aldolase erfolgte nach der von DIKOW vorgeschlagenen Methode (13). Zur Untersuchung wurde Material von Tumoren und vom

tumorfreen Teil der Leber der Versuchstiere entnommen sowie von der Leber der Kontrolltiere. Wir homogenisierten das Material bei 0°, zentrifugierten 30 Min. bei 160000 g und 0°. Den klaren Überstand benutzten wir zur Trennung der Isoenzyme nach oben genanntem Verfahren.

Ergebnisse

Im 7. Monat nach Versuchsbeginn bildeten sich in der Leber einzelne große und viele kleinere Tumoren (Abb. 1). Diese stellten histologisch hepatozelluläre Karzinome dar, deren Zellen in bezug auf Größe, Intensität der cytoplasmatischen Basophilie und ihrer mitotischen Aktivität variierten. Im Tumorparenchym konnten öfters einzelne oder gruppierte Zellnekrosen beobachtet werden, wobei in einzelnen Fällen auch makroskopisch nekrotische Bereiche an den Tumoren festgestellt werden konnten. Die Gesamtdolaseaktivität im Serum der sechs untersuchten Ratten mit primären Lebertumoren betrug durchschnittlich 115,5 mU/ml, während wir bei den Kontrolltieren 54,6 mU/ml fanden.



Abb. 1
Rattenleber mit Tumoren von verschiedener Größe, die Diäthylnitrosamin-induzierte primäre Leberkarzinome darstellen

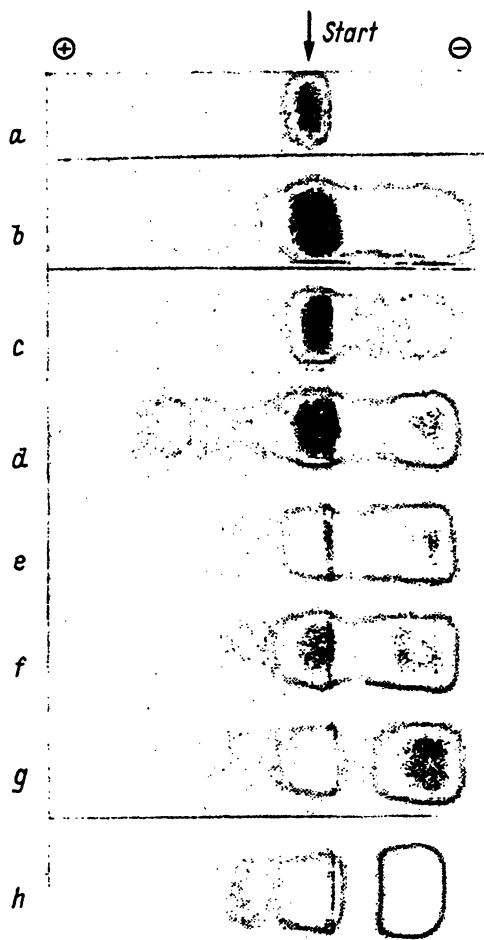


Abb. 2

Isozymmuster der Aldolase bei Ratten

- a) im Serum eines Kontrolltieres
 b, c, d) im Serum von Ratten mit Diäthylnitrosamin induzierten Lebertumoren
 e, f) im Parenchym der primären Lebertumoren
 g) im nicht vom Tumortumoren einbezogenen Bereich der Leber eines Versuchstieres
 h) in der Leber eines Kontrolltieres

Das Isozymmuster der Aldolase im Serum, in den Tumoren und der Leber ist auf Abbildung 2 dargestellt. Bei den Kontrolltieren besteht das Isozymmuster der Serumaldolase aus einer intensiven Fraktion, die sich anodisch bei der Startlinie befindet und aus einer schwächeren Fraktion am anodischen Ende des Zymogramms. Außerdem befinden sich kathodisch bei der Startlinie zwei kaum bemerkbare Isoenzymfraktionen, die nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit mit den entsprechenden Fraktionen der Leberaldolase übereinstimmen und vom Typ Aldolase B sind (Abb. 2 a). Das Isozymmuster der Serumaldolase bei Tieren mit Lebertumoren ist auf Abbildung 2 b, c, d dargestellt. Hieraus ist zu ersehen, daß die anodisch bei der Startlinie liegende Fraktion, sowie diejenige am anodischen Ende des Zymogramms eine mehrfach erhöhte Intensität besitzen. Zwischen ihnen treten außerdem zwei neue Fraktionen hervor, die in manchen Fällen ziemlich intensiv sind (Abb. 2 d). Auf der kathodischen Seite des Zymogramms erscheinen vier deutlich dargestellte und intensive Isoenzymfraktionen vom Typ Aldolase B. Im Isozymmuster der Aldolase in den Lebertumoren (Abb. 2 e, f) werden eine anodisch bei der Startlinie liegende Fraktion und zwei schwächere am anodischen Ende des Zymogramms nachgewiesen. Kathodisch von

der Startlinie befinden sich vier Fraktionen, die ziemlich intensiv, deutlich voneinander abgesondert und vom Typ Aldolase B sind. In den Bereichen der nicht in den Tumortumoren einbezogenen Leber der Versuchstiere sind diese vier kathodischen Isoenzymfraktionen nicht nachweisbar. Es werden nur zwei intensive kathodische Fraktionen beobachtet, die wegen ihrer nahen Lage, ähnlich wie bei der normalen Leber (Abb. 2 h), zusammenfließen (Abb. 2 g).

Diskussion

An Patienten mit primären Lebertumoren wurden sehr hohe Werte der Serumaldolaseaktivität festgestellt (2). Diese Angaben stimmen mit den Ergebnissen vorliegender Arbeit bei Diäthylnitrosamin-induzierten Lebertumoren an Ratten überein. Bei Untersuchungen des Isozymmusters der Serum-Lactatdehydrogenase an Kranken mit verschiedenen Tumoren, erhielten RICHTERICH und Mitarbeiter sehr verschiedene Ergebnisse. Daher resultiert ihre Auffassung, daß dieser Untersuchung keine diagnostische Bedeutung zugesprochen werden kann (14). Später jedoch stellten RUBERTI und Mitarbeiter (15) bei ähnlichen Untersuchungen fest, daß die Bestimmung des Isozymmusters der Serum-Lactatdehydrogenase bei Kranken mit verschiedenen Tumoren von Bedeutung für die Differentialdiagnose des Krebses ist. Dies wird von ZIEGENBEIN (16) unterstützt, nach dem vor allem das Isozymmuster der verschiedenen Enzyme in den Tumoren und in den entsprechenden normalen Geweben untersucht werden muß. Erst darauf können die Veränderungen im Serum gesucht werden.

Bei unseren vorhergehenden Untersuchungen über das Isozymmuster der Serumaldolase sowohl bei Kranken an infektiöser Hepatitis (8) als auch bei toxischer Schädigung mit verschiedenen Agentien der Leber an Ratten (9, 10, 11) stellten wir gleichzeitig mit der beträchtlich erhöhten Serumaldolaseaktivität auch wesentliche Veränderungen in ihrem Isozymmuster fest. Im kathodischen Teil des Zymogramms beobachteten wir (im Vergleich zu Normalfällen) zwei kathodische Isoenzymfraktionen mit mehrfach erhöhter Intensität, die nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit vollkommen mit den zwei kathodischen Fraktionen der Leberaldolase übereinstimmen. Im kathodischen Teil des Isozymmusters der Aldolase der untersuchten primären Lebertumoren an Ratten konnten vier Isoenzymfraktionen nachgewiesen werden, die nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit und Substratspezifität gegenüber Fructose-1,6-diphosphat und Fructose-1-phosphat vom Typ Leber Aldolase B sind (17). Im Isozymmuster der Serumaldolase bei diesen Ratten waren vier kathodische Fraktionen vom Typ Aldolase B nachweisbar, die nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit vollkommen mit den kathodischen Fraktionen der Aldolase von den Tumoren übereinstimmen, aus der sie auch offensichtlich hervorkommen. Dadurch wird bewiesen, daß ein wesentlicher Teil der Serumaldolase bei Ratten mit primären Lebertumoren aus jenen Tumoren

stammt, deren Zellen infolge schnellen Wachstums und schwacher Blutzufuhr leicht geschädigt werden und nekrotisieren. Die Veränderungen im anodischen Teil des Zymogramms der Serumaldolase an Ratten mit Lebertumoren beobachtet man auch bei infektiösen und toxischen Leberschädigungen. Sie sind wahrscheinlich auf die Einbeziehung auch von anderen Organen in den pathologischen Vorgang zurückzuführen.

Die unsererseits nachgewiesenen Veränderungen im Isoenzymmuster der Serumaldolase an Ratten mit primären Lebertumoren sind bei anderen Leberschädigungen nicht festzustellen. Ihres spezifischen Charakters wegen haben sie eine wichtige Bedeutung für die Tumordiagnostik.

Literatur

1. WARBURG, O. und W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.* 314, 399 (1943).
2. KRUSANOWA, N. I. und A. I. KRASSOWSKAJA, *Vopr. onkol., UdSSR*, 9, 9 (1963). — 3. SARAGOÇA, A., *Amer. J. Digest. Dis.* 9, 337 (1964). — 4. BRUNS, F. und W. PULS, *Klin. Wschr.* 32, 656 (1954). — 5. BRUNS, F. und W. JACOB, *Klin. Wschr.* 32, 1041 (1954). — 6. TAN, C., *Cancer* 16, 1373 (1963). — 7. SIBLEY, J., G. HIGGINS und G. FLEISCHER, *Amer. Med. Ass. Arch. Pathol.* 59, 715 (1955). — 8. DIKOW, A. L. und M. ROMANOW, *Zschr. ges. Inn. Med.* 23, 471 (1968). — 9. DIKOW, A. L. und D. HADJIOLOV, diese Z. 7, 160 (1969). — 10. DIKOW, A. L. und D. HADJIOLOV, diese Z. 7, 556 (1969). — 11. DIKOW, A. L. und D. HADJIOLOV, diese Z. 8, 35 (1970). — 12. DIKOW, A. L. und V. GENOWA, diese Z. 7, 155 (1969). — 13. DIKOW, A. L., diese Z. 6, 386 (1968).
14. RUPPINGER, K., R. RICHTERICH und E. ROSSI, *Schweiz med. Wschr.* 92, 198 (1962). — 15. RUBERTI, A., E. CASTELLANI und G. TOBALDINI, *Arcispedale S. Anna Ferrara*, 19, 1079 (1966). — 16. ZIEGENBEIN, R., *Klin. Wschr.* 43, 1337 (1965). — 17. HADJIOLOV, D. und A. L. DIKOW, *Zschr. Krebsforsch.* (1970) in Druck.

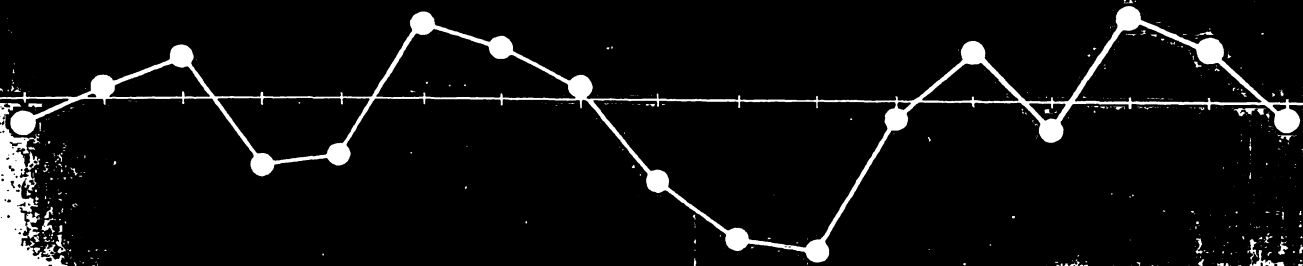
Dr. med. Angel L. Dikow
Ruhr-Universität
Lehrstuhl Biochemie
4630 Bochum-Querenburg
Postfach 2148

Qualitäts- kontrolle

mit

Versatol[®]

im klinisch-chemischen Labor



Überwachung von Präzision
und Richtigkeit
im normalen
und pathologischen Bereich

Bilirubin
Calcium
Chlorid
Freies Cholesterin
Gesamt-Cholesterin
Kreatinin
Glukose
Rest-N
Anorg. Phosphor
Eiweißgebundenes Jod
Kalium
Gesamt-Stickstoff
Gesamt-Eiweiß
Natrium
Harnstoff-N
Harnsäure
Alkalische Phosphatase
Saure Phosphatase
Amylase
Lipase
Transaminase GOT
Laktat-Dehydrogenase LDH

GÖDECKE

Technicon Symposium 70

**Kurhaus
Bad Homburg v.d. Höhe
29./30. Januar 1970**

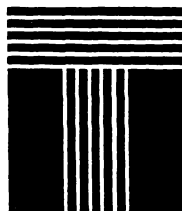
- * Biochemische Vielfachanalyse
- * Klinische Chemie
- * Hämatologie, Immunologie, Serologie
- * Chromatographie

Deutsche und ausländische Wissenschaftler werden am 29. und 30. Januar 1970 in Bad Homburg v.d.H. über die Ergebnisse ihrer Arbeit in der Automation klinisch-chemischer, hämatologischer, immunologischer, serologischer und chromatographischer Analysenverfahren berichten.

Dabei werden die Vorträge und Diskussionen um die Erstellung biochemischer Profile einen wichtigen Platz einnehmen.

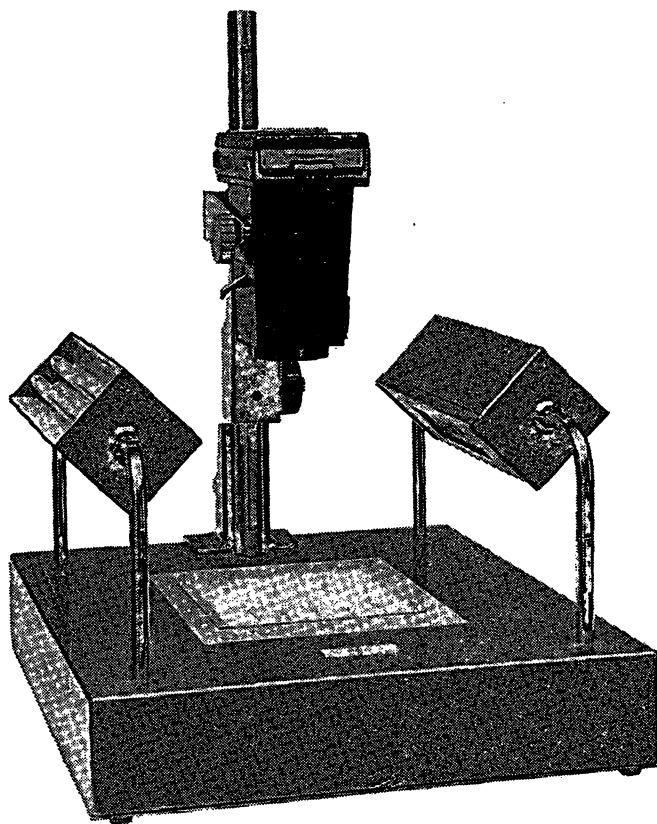
Das Kernstück eines modernen Laboratoriums wird im Routinebetrieb demonstriert.

Tagungsunterlagen senden wir auf Anforderung gerne zu.



Technicon GmbH
6 Frankfurt (Main)
Sternstraße 8
Tel. 06 11/59 02 21-3

Zum fehlerfreien Photographieren von Dünnschicht- Chromatogrammen CAMAG REPRO-STAR



Mit dem CAMAG REPRO-STAR photographieren Sie unter langwelligem UV, kurzwelligem UV und im sichtbaren Licht, im Auflicht- oder im Durchlichtverfahren.

Der REPRO-STAR ist so konstruiert, dass jede Aufnahme einwandfrei gelingt: Richtige Belichtungszeit, richtige Blende, richtige Scharfeinstellung und zwar mit jeder Kamera. (Ein Kamerawechsel dauert nur Sekunden.)

Verlangen Sie unser ausführliches Angebot.

CAMAG

Homburgerstrasse 24
4132 MuttENZ/Schweiz

Unser Zweigbetrieb in der
Bundesrepublik:
1 Berlin 45, Baseler Strasse 65

Führend in Dünnschicht-Chromatographie
Dünnschicht-Elektrophorese
Hochspannungs-Elektrophorese